

20050088/A

厚生労働省科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

難治性重症型表皮水疱症の画期的治療法の  
開発に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

平成18(2006)年3月

主任研究者 清水 宏

# 目次

## I. 総括研究報告

難治性重症型表皮水疱症の画期的治療法の開発に関する研究 .....	1
主任研究者 清水 宏 (北海道大学)	

## II. 分担研究報告

1. 表皮水疱症の診断や遺伝子変異に関する研究 .....	7
主任研究者 清水 宏 (北海道大学)	
2. リコンビナント VII 型コラーゲンに関する研究 .....	10
分担研究者 澤村大輔 (北海道大学)	
3. VII 型コラーゲンの遺伝子の皮膚細胞への導入 .....	14
分担研究者 古市泰宏 (株式会社ジーンケア研究所)	
4. 造血幹細胞由来表皮細胞の遊走機序に関する研究 .....	19
分担研究者 阿部理一郎 (北海道大学)	
5. 表皮の幹細胞と RNA 結合蛋白 Musashi .....	21
分担研究者 秋山真志 (北海道大学)	

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....

	25
--	----

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....

	29
--	----

# I. 総括研究報告

## 厚生労働省科学研究費補助金

(難治性疾患克服研究事業)

総括研究報告書

難治性重症型表皮水疱症の画期的治療法の開発に関する研究

主任研究者 清水 宏

北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 教授

### 研究要旨

本研究の対象疾患は、軽微な外力により皮膚に容易に水疱や潰瘍を生じ、患者の QOL が著しく障害される重症型表皮水疱症である。今回、VII 型コラーゲンの蛋白補充療法ならびに骨髄移植で本症を治療するという画期的治療法の開発研究を継続して行った。その結果、本邦栄養障害型表皮水疱症の臨床型と遺伝子型の関連を明らかにできた。また、合成 VII 型コラーゲンの実験動物への投与から蛋白補充療法の有用性を確認した。さらに、表皮幹細胞と造血幹細胞の研究から、表皮水疱症への骨髄移植療法の可能性が示唆された。

### A 研究目的

本研究の対象疾患は、軽微な外力により皮膚に容易に水疱や潰瘍を生じ、患者の QOL が著しく障害される重症型表皮水疱症である。近年の分子生物学的研究の進歩で、多くの重症型表皮水疱症の原因遺伝子が VII 型コラーゲン遺伝子であり、患者皮膚ではその蛋白が皆無であることが明らかにされた。しかしながら、現在有効な治療法はなく、画期的治療法の開発が急務である。清水宏を代表とする研究グループは、平成 13-15 年に厚労省科学研究費の補助を受け、構造蛋白である VII 型コラーゲンを補充する治療の基礎的研究を行った。その結果、本蛋白を合成単離する方法を確立し、その合成 VII 型コラーゲンが皮膚の創傷治癒を促進することを明らかにしている。

この過去 3 年の研究成果を基盤として、1) 早期に臨床応用可能な、合成 VII 型コラーゲン蛋白を補充するという新しい発想に基づく治療法を実現し、2) さらに骨髄移植を行い、移植された骨髄幹細胞より分化した皮膚細胞から VII 型コラーゲンを供給させるという新しい観点から再生治療も検討し、難治性皮膚疾患である表皮水疱症の画期的治療法を確立するのが本研究の目的である。

### B 研究方法

#### 1) 表皮水疱症患者の診断に関する研究

2000 年から現在まで、北大皮膚科を受診あるいは北大皮膚科に依頼のあった栄養障害型表皮水疱症患者について、臨床症状や家族歴を詳しく聴取した。次に皮膚生検を行い、電顕、各種基底膜蛋白に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学検索を行い、基底膜における微細構造、発現蛋白の変化を観察した。さらに、患

者本人、ならびに家族から採血を行い、genomic DNA を抽出し、PCR、heteroduplex、direct sequencing 法などを用いて DNA 解析を行なった。

## 2) リコンビナント VII 型コラーゲンに関する研究

遺伝子工学を用いて、293細胞から精製されたリコンビナント VII 型コラーゲンを phosphate buffered saline (PBS) に 1mg/ml の濃度に溶解した。次に、100 $\mu$ g を含む 0.1ml を 10匹のマウスの皮内に局注し、局所の反応性と全身性の反応を検討した。対照は phosphate buffered saline (PBS) のみのものとした。次に、ヌードラットの背部皮膚に 2cm 四方の潰瘍を作成して、その部に VII 型コラーゲンのノックアウトマウスの皮膚を移植し、皮膚が生着した 1週間後実験に使用した。精製したリコンビナント VII 型コラーゲン蛋白 20 $\mu$ g を生食に 1,0ml に溶解し、3日おきに、ヘアレスラットおよび植皮された VII 型コラーゲンノックアウトマウスの皮内に局所注射した。5回リコンビナント VII 型コラーゲンを投与した後、投与部位から皮膚を採取し、免疫学的に VII 型コラーゲンの発現を検討した。

## 3) VII 型コラーゲンの遺伝子導入に関する研究

Hallopeau-Siemens 劣性優性栄養障害型表皮水疱症患者から得られた、培養表皮細胞と線維芽細胞を使用した。VII 型コラーゲンの cDNA をレトロウイルスベクターである pDON-A1 ベクターに組み込み、gag, env, pol 遺伝子を導入してあるプロデュース細胞に導入した。導入効率をあげるため、ウイルスにレトロネクチンを添加してから加える試み、また VSV-G エンベロープタンパク発現ベクターを同時に導入する方法を用いている。ウイルスの上清を超速心にて種々の濃度に濃縮して培養表皮細胞と線維芽細胞の培地に添加した細胞での発現は細胞を直接 VII 型コラーゲンのモノクローナル抗体である LH7.2 で染色して検討した。また、細胞液中の VII 型コラーゲンについては、同様の抗体でイムノブロットを行い検出した。

## 4) 皮膚の幹細胞に関する研究

RT-PCR と免疫ブロット法を用いて、Musashi1 と Musashi2 の mRNA と蛋白の発現を検討した。対象とする細胞は、培養マウス表皮細胞と培養ヒト表皮細胞であった。抗 Musashi-1 抗体 (Msi-1)、および、抗 Musashi-2 抗体 (Msi-2) を用いて免疫染色を行なった。対象組織としては、C57BL/6J マウス 胎児皮膚、および、ヒト胎児皮膚 (胎生 49日—163日) を用いた。次に、同様の抗体を用いて、新生児マウスの皮膚の免疫染色を行った。対象とした組織は、C57BL/6J マウス新生児皮膚を用いた (1日齢、4日齢、8日齢、11日齢、18日齢、21日齢)。

## 5) 骨髄幹細胞から表皮細胞への分化に関する研究 :

皮膚再生の現象の場である、創傷治癒過程の皮膚における細胞遊走因子のスクリーニングを行い、候補となる遊走因子を数種同定した。同定したそれぞれの遊走因子において、骨髄幹細胞への遊走惹起能を in vitro で検討した。さらに皮膚創傷部位への骨髄由来表皮細胞遊走への、それぞれの遊走因子の影響を検討した。骨髄由来表皮細胞増加の、皮膚再生過程に対する寄与を解析するため、上記同定遊走因子を皮膚創傷部位に投与することによる、創傷治癒への影

響を検討した。

#### 6) 倫理面に対する配慮

本研究はヒト遺伝子解析、皮膚の生検、治療研究が行われるので、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による対象者に対する不利益や危険性の排除、説明と理解（インフォームドコンセント）に係わる状況を鑑がみ、患者、家族からの強い希望、同意があったときのみ施行した。また、すべての研究は実施期間での倫理委員会の承認を得ている。

### C 研究結果

#### 1) 表皮水疱症患者の診断に関する研究

対象とした患者20例の内訳は、優性栄養障害型4例、非Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型10例、Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型6例であった。VII型コラーゲン遺伝子の変異検索の結果、16の新規変異を含む30の変異を同定した。優性型では、G2034R (6100G>A), G2037E (6110G>A), G2064E (6191G>A), 8069del17insGA: 非Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型では、G1595R(4783G>A), G1815R(5443G>A), R1957Q(5870G>A), G2366C(7096G>T), C2875F(8627G>T), R236X(706C>T), R1340X(4018C>T), R1978X(5932C>T), Q2827X(8479C>T), E2857X(8569G>T), 5818delC, 5604+2G>C, 6573+1G>C, 8109+2T>A, 8358+1G>Tを認めた。また、Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型では、R137X(409C>T), Q641X(1921C>T), R1683X(5047C>T), R2261X(6781C>T), 434insGCAT, 1474del18 and 5818delC, 6081insCを認めた。

#### 2) リコンビナントVII型コラーゲンに関する研究

リコンビナントVII型コラーゲンを100 $\mu$ g投与したマウスでは、すべてのマウスに全身反応は認めなかった。さらに、投与部位においても、一週間まで確認したが、紅斑、出血、腫瘍形成などの異常な所見は認めなかった。ヘアレスラットに計5回投与した後に皮膚を採取し、VII型コラーゲンへのモノクローナル抗体を用いて、VII型コラーゲンの沈着を確認した。その結果、投与部位に一致して、VII型コラーゲンが基底膜に沿って線状に沈着していた。その他、表皮などには異常に沈着は認めなかった。次に、栄養障害型表皮水疱症のモデルマウスであるVII型コラーゲンのノックアウトマウスの皮膚に投与を行った。ノックアウトマウスの皮膚を無免疫のヌードラットに移植して、その皮膚にリコンビナントVII型コラーゲンを投与した。その結果、VII型コラーゲンが基底膜に線状に染色された。

#### 3) VII型コラーゲンの遺伝子導入に関する研究

種々の濃度に濃縮したウイルス粒子をHallopeau-Siemens 劣性優性栄養障害型患者から得られた培養表皮細胞と線維芽細胞の培地に添加して、細胞の障害の程度とVII型コラーゲンの発現を検討した。ウイルスの濃縮を10倍にすると、陽性率は約13%出会った。さらに、50倍に濃縮するとVII型コラーゲン陽性細胞の割合は、25%に上昇した。表皮細胞と線維芽細胞ともに同じ陽性率で、50倍濃縮でも細胞障害は認めなかった。培養細胞をVII型コラーゲ

ンの発現を抗体にて検討した所、表皮細胞は細胞質の周囲に、線維芽細胞は細胞全体に染色された。ウエスタンブロットでは、290 kD のバンドを表皮細胞と線維芽細胞ともに認めた。培養細胞から DNA を採取して、VII 型コラーゲンの cDNA をプローブとしてサザンブロットを行った所、表皮細胞と線維芽細胞に同様のバンドを検出し、挿入された VII 型コラーゲン遺伝子の数も同様であることが推測された。

#### 4) 皮膚の幹細胞に関する研究

RT-PCR と免疫ブロットによって、Musashi1 と Musashi2 の mRNA と蛋白は培養マウス表皮細胞に発現していることが確認されたが、ヒト表皮細胞では、Musashi1 のみ、mRNA と蛋白が認められた。マウスでは、免疫組織学的に、Musashi1、Musashi2 は、胎生 14.5 日から成体までの表皮と毛包に発現していた。Musashi と毛周期の関連について調べると、成長期早期では、Musashi、Musashi2 はバルジと 2 次毛芽に発現しており、成長期後期では、内毛根鞘、とりわけ、毛包中位の内毛根鞘の細胞に限局存在していた。ヒト皮膚では、Musashi1 は胎生期毛包の細胞に発現していたが、成人の毛包では、発現は認められなかった。

#### 5) 骨髄幹細胞から表皮細胞への分化に関する研究：

現在までの検討で、皮膚創傷部位に特異的に発現し、かつ骨髄幹細胞の遊走を特異的に誘導する、表皮細胞特異的遊走因子を同定した。この同定因子は生体内においても骨髄由来表皮細胞の数を増加させた。骨髄由来表皮細胞増加の創傷治癒への影響の検討の結果、上記同定遊走因子を皮膚創傷部位に投与することにより、創傷治癒が有意に促進されることが明らかになった。

### D 考察

#### 1) 表皮水疱症患者の診断に関する研究

優性型の変異では、4 グリシン置換は既知の報告であったが、8069del17insGA は新規の変異であった。17 塩基の欠失であるが、2 塩基 GA の挿入があるため、open reading frame が止まることがない。逆に蛋白がつくられてしまうため、一方のアリルから作られる正常の VII 型コラーゲンの機能を障害する dominant-negative 効果が出てしまうため、優性形になると考えられた。劣性型では、16 例の内、Hallpeau-Siemens 型 6 例、非 Hallpeau-Siemens 型劣性型 10 例であり、海外での比 3 : 1 に大体一致するものであった。一般に、Hallpeau-Siemens 型が早期終止コドンの組み合わせ、非 Hallpeau-Siemens 型それ以外の組み合わせで生ずると報告されているが、今回の検索でも、同様で例以外はなかった。また、15 の劣性型の新規変異を同定したが、日本人でも VII 型コラーゲンの変異は家系特異であることが予想された。日本人特有の変異として、5818delC, 6573+1G>C, E2857X の 3 変異が報告されているが、今回でもそれらの変異が認められた。さらに、Q2827X を 2 家系に認め、この変異も日本人に多い変異であることが推測された。

## 2) リコンビナント VII 型コラーゲンに関する研究

まず、安全性のチェックのため、大量のリコンビナント VII 型コラーゲンをマウスに投与した。今回個々のマウスには、VII 型コラーゲンを 100 $\mu$ g 投与した。ヒトの臨床研究では、1 部位に 300 $\mu$ g を投与予定であるので、約 20g のマウスでは、プロキロ当たり、ヒトの約 600 倍の量となる。それほど大量の VII 型コラーゲンを投与しても、全身の副作用は認められず、局所の異常反応もなかった。この結果は、少なくとも、我々が精製したリコンビナント VII 型コラーゲンには毒性がないことが確かめられた。次に、このリコンビナント VII 型コラーゲンの栄養障害型患者への治療法としての有効性を検討するため、正常のラットの皮膚に局注した。その結果、リコンビナント VII 型コラーゲンをラットの皮膚に局注すると基底膜に沈着することを確認した。さらに、我々は栄養障害型のモデルである VII 型コラーゲン遺伝子のノックアウトマウス（劣性栄養障害型のモデルマウス）の水疱部にヒト VII 型コラーゲン蛋白を局注する実験を行った。確かに、VII 型コラーゲンが水疱の基底膜部に沈着することを確認している（データは提示せず）。しかしノックアウトマウスは生後間もなく死亡するため、経過を比較的長期に VII 型コラーゲンの沈着の有無を確認することができなかった。そこで、ノックアウトマウスの皮膚を採皮し、ヌードラットに植皮後、その皮膚にヒト VII 型コラーゲン蛋白を局注した。その結果、ノックアウトマウスの基底膜部に VII 型コラーゲン蛋白が組み込まれ、VII 型コラーゲン投与が本症の表皮真皮の解離の改善に効果がある可能性が示唆された。

動物の真皮内に注入されたヒト VII 型コラーゲン蛋白がどのように基底膜に集積されるかどうかは不明であるが、この結果、VII 型コラーゲン蛋白補充療法は栄養障害型表皮水疱症患者における治療選択肢の 1 つになると考えられる。

## 3) VII 型コラーゲンの遺伝子導入に関する研究

今回は、実際の遺伝子治療を想定して、劣性栄養障害型患者から得られた表皮細胞と線維芽細胞に我々が確立したレトロウイルス法にて、VII 型コラーゲンの遺伝子の導入を試みた。実際に、種々の濃度に濃縮したウイルス粒子を培地に添加して、細胞の障害の程度と VII 型コラーゲンの発現を検討した。やはり濃縮の程度に陽性率は比例し、濃縮を 50 倍に濃縮すると VII 型コラーゲン陽性細胞の割合は、25%にまで上昇した。尚、表皮細胞と線維芽細胞ともに同じ陽性率で（図 1）、50 倍濃縮でも細胞障害は認めなかった。レトロウイルスでの導入可能な遺伝子は 8-9 k B であり、VII 型コラーゲンの cDNA は 9 k B である。従って、VII 型コラーゲンは限界近い長さであり、このような場合、正常な VII 型コラーゲンが発現されない場合が多い。そこで、まず、遺伝子導入細胞を VII 型コラーゲンの抗体で染色した。その結果、正常に近い分布であった。さらに、イムノブロットでそのサイズを確かめた所、290 k D であり、正常の VII 型コラーゲンが産生されていると考えられた。また、その発現量は、表皮細胞と線維芽細胞で同様であった。次に挿入された VII 型コラーゲン遺伝子量を、サザンブロットで検討した。その結果、プローブで表出されたバンドは両細胞で同様であり、挿入された遺伝子量は等量であると結論した。

#### 4) 皮膚の幹細胞に関する研究

RNA-binding protein である Musashi family は、神経幹細胞の維持と神経の幹細胞から神経細胞へ分化する際の非対称性分裂に関連している。今回の我々の研究の結果から、マウス表皮細胞は Musashi1 と Musashi2 発現しているが、ヒト表皮細胞は Musashi1 のみを発現していることが確認された。さらに、胎生期マウスでは、Musashi1、Musashi2 は、胎生 14.5 日から成体までの表皮と毛包に発現していた。毛周期の各時期の Musashi の発現については、成長期早期では、Musashi1、Musashi2 はバルジと 2 次毛芽に発現しており、成長期後期では、内毛根鞘、とりわけ、毛包中位の内毛根鞘の細胞に局限して発現していた。他の組織における Musashi の発現様式から、表皮、毛包上皮においても、Musashi は幹細胞および幹細胞に由来する未分化な細胞に発現していると予想されたが、今回の結果は、Musashi は毛包中位の内毛根鞘の細胞にも特異的に発現し、機能していることを示していた。

#### 5) 骨髄幹細胞から表皮細胞への分化に関する研究：

本年度の研究で、骨髄由来表皮細胞の割合を増加させるために、骨髄由来表皮細胞特異的遊走因子を同定した。さらに実際に、この因子が、生体内における骨髄由来表皮細胞の割合を増加させることも明らかにした。加えて、骨髄由来表皮細胞増加の創傷治癒への影響も検討し、創傷治癒を促進させることを明らかにした。今後は現在までの成果を、臨床応用に近づけるべく、表皮構造タンパク欠損マウス（VII 型コラーゲンノックアウトマウス）への正常マウスから骨髄移植療法を行う。

#### E 結語

今回の研究で、新たに栄養障害型表皮水疱症の臨床型と遺伝子型の関連をさらに明らかにできた。また、VII 型コラーゲンの補充療法の有用性を実験動物で確認した。さらに、表皮水疱症への表皮幹細胞や骨髄幹細胞を用いる新しい再生治療の可能性が示唆された。

#### F 健康危険情報

特になし

#### G 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

#### H 知的財産の出願・登録状況

特になし。

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金  
(難治性疾患克服研究事業)  
分担研究報告書

表皮水疱症の診断や遺伝子変異に関する研究  
主任研究者 清水 宏  
北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 教授

研究要旨

表皮水疱症の診断の確定や新しい治療法への適応の決定のため、北大皮膚科を受診または外部機関から依頼のあった日本人の栄養障害型表皮水疱症患者の変異検索を行った。その結果、新しい変異を多数見出したが、いまだ遺伝子変異と臨床症状の関連が明確にならない部分も多く、さらに多くの症例の解析が必要と思われ、今後も遺伝子診断を継続する。

A 目的

表皮水疱症は軽微な外力により、皮膚に容易に水疱や潰瘍を生ずる疾患の総称である。近年の皮膚分子生物学の進歩により、ケラチン5、14、プレクチン、180kD 類天疱瘡抗原、 $\alpha 6\beta 4$  インテグリン、ラミニン5、VII型コラーゲンなどの表皮真皮の結合に関与する構造蛋白をコードする遺伝子の変異により本症が発症することが明らかとなった。

しかしながら、いまだに各遺伝子の変異と臨床症状関連は明確には明らかにされていない。また、新しい治療法などの開発には、患者さんの診断を確実にしなければならない。今回の研究では、日本人栄養障害型患者のVII型コラーゲン遺伝子の変異の検索を行なった。

B 研究方法

2000年から現在まで、北大皮膚科を受診あるいは北大皮膚科に依頼のあった栄養障害型表皮水疱症患者について、臨床症状や家族歴を詳しく聴取した。さらに、皮膚生検を行い、電顕、各種基底膜蛋白に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学検索を行い、基底膜における微細構造、発現蛋白の変化を観察した。さらに、患者本人、ならびに家族から採血を行い、genomic DNAを抽出し、PCR、heteroduplex、direct sequencing法などを用いて、VII型コラーゲン遺伝子の変異解析を行なった。尚、患者は全て日本人である。

倫理面への配慮

本研究はヒト遺伝子解析、皮膚の生検、治療研究が行われるので、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による対象者に対する不利益や危険性の排除、説明と理解(インフォームドコンセント)に係わる状況を鑑がみ、患者、家族からの強い希望、同意があったときのみ施行した。

## C 研究結果

対象とした患者20例の内訳は、優性栄養障害型4例、非Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型10例、Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型6例であった。患者20例、VII型コラーゲン遺伝子40アレルについてVII型コラーゲン遺伝子の変異検索を行った。その結果、16の新規変異を含む30の変異を同定した(表)。優性型では、G2034R(6100G>A)、G2037E(6110G>A)、G2064E(6191G>A)、8069del17insGAを認めた。非Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型では、G1595R(4783G>A)、G1815R(5443G>A)、R1957Q(5870G>A)、G2366C(7096G>T)、C2875F(8627G>T)、R236X(706C>T)、R1340X(4018C>T)、R1978X(5932C>T)、Q2827X(8479C>T)、E2857X(8569G>T)、5818delC、5604+2G>C、6573+1G>C、8109+2T>A、8358+1G>Tを認めた。Hallopeau-Siemens 劣性栄養障害型では、R137X(409C>T)、Q641X(1921C>T)、R1683X(5047C>T)、R2261X(6781C>T)、434insGCAT、1474del8 and 5818delC、6081insCを認めた。

## D 考察

全身の水疱形成を認める栄養障害型では、水疱は表皮下の真皮レベルで形成されるため、水疱治癒後に瘢痕、稗粒腫を残す。爪の変形も起こる。電顕的には、lamina densa直下の真皮に形成され、anchoring fibrilに種々の程度の形成不全がある。栄養障害型はanchoring fibril構成蛋白であるtype VII collagen遺伝子の変異により起こる。多くの優性型はコラーゲン領域のグリシンが他のアミノ酸に変化するグリシン置換が片方の対立遺伝子に存在する。劣性型はVII型コラーゲンに対するモノクローナル抗体を用いる蛍光抗体法にて、その発現が欠損するのがHallopeau-Siemens型であり、非Hallopeau-Siemens型ではその発現が現弱している(図9)。正確な亜型の診断には、VII型コラーゲン遺伝子変異検索が必要である。

今回の優性型の変異では、4グリシン置換は既知の報告であったが、8069del17insGAは新規の変異であった。17塩基の欠失であるが、2塩基GAの挿入があるため、open reading frameが止まることがない。逆に蛋白がつくられてしまうため、一方のアレルから作られる正常のVII型コラーゲンの機能を障害するdominant-negative効果が出てしまうため、優性形になると考えられた。

今回の検索では、劣性型16例の内、Hallopeau-Siemens型6例、非Hallopeau-Siemens型劣性型10例であり、海外での比3:1に大体一致するものであった。一般に、Hallopeau-Siemens型が早期終止コドンの組み合わせ、非Hallopeau-Siemens型それ以外の組み合わせで生ずると報告されているが、今回の検索でも、同様で例以外はなかった。また、15の劣性型の新規変異を同定したが、日本人でもVII型コラーゲンの変異は家系特異であることが予想された。日本人特有の変異として、5818delC、6573+1G>C、E2857Xの3変異が報告されているが、今回の検索でも5818delCは4家系に、6573+1G>Cは2家系に認められたが、E2857Xは一家系のみであった。さらに、Q2827Xを2家系に認め、この変異も日本人に多い変異であることが推測された。

## E 結論

日本人の栄養障害型表皮水疱症患者の変異検索を行った。その結果、海外の変異報告とおおむね同様の結果であったが、日本人特有の変異も同定し得た。今回の研究でも、いまだ遺伝子変異と臨床症状の関連が明確にならない部分も多く、さらに多くの症例の解析が必要と思われ、今後も遺伝子診断を継続する。

## F 健康危険情報

特になし。

## G 研究発表

論文 1)

Sawamura D, Goto M, Yasukawa K, Sato-Matsumura K, Nakamura H, Ito K, Nakamura H, Tomita Y, Shimizu H. Genetic studies of 20 Japanese families of dystrophic epidermolysis bullosa. *J Hum Genet* 50: 543-546, 2005.

論文 2)

Sawamura D, Niizeki H, Miyagawa S, Shinkuma S, Shimizu H. A novel indel *COL7A1* mutation 8068del17ins-GA causes dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol*, in press.

## H 知的財産の出願・登録状況

特になし

リコンビナント VII 型コラーゲンに関する研究  
分担研究者 澤村大輔  
北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 助教授

## 研究要旨

表皮水疱症の新しい治療法への開発のため、VII 型コラーゲン遺伝子導入細胞から得られたリコンビナント VII 型コラーゲンの有用性を検討した。今回、その蛋白を実験動物の皮膚に投与したところ、基底膜への取り込みが認められた。リコンビナント VII 型コラーゲンの補充療法は有用な治療法であることが示唆され、さらに研究を進めることに決定した。

## A 目的

表皮水疱症は軽微な外力により、皮膚に容易に水疱や潰瘍を生ずる疾患の総称である。近年の皮膚分子生物学の進歩により、ケラチン 5、14、プレクチン、180kD 類天疱瘡抗原、 $\alpha 6\beta 4$  インテグリン、ラミニン 5、VII 型コラーゲンなどの表皮真皮の結合に関与する構造蛋白をコードする遺伝子の変異により本症が発症することが明らかとなった。

しかしながら、現在有効な治療法はなく、画期的治療法の開発が急務である。そこで我々は、表皮水疱症で欠損する蛋白と直接補充する治療の開発を行っている。前回の研究では、VII 型コラーゲン遺伝子を培養細胞に導入し、その上清から得られるリコンビナント VII 型コラーゲンの機能を検討し、正常と同様の機能を持つことを確認した。今回の研究では、そのリコンビナント蛋白を動物に投与して、安全性ならびにその有用性を検討した。

## B 研究方法

VII 型コラーゲンの cDNA は 9kb と長いため、Flp-in system を採用した。始めに、293 細胞に pFRT/lacZeo ベクターを導入することにより、それらの細胞のゲノムに Flp recombinase の標的となる FRT 部位を挿入した。次に、VII 型コラーゲン cDNA を発現ベクターである pcDNA5/FRT に組み込み、Flp recombinase の発現ベクターを co-transfection し、VII 型コラーゲン発現細胞を選択した。上清に分泌されるリコンビナント VII 型コラーゲンは 30% 硫酸塩析後、VII 型コラーゲンのモノクローナル抗体である LH7.2 のアフィニティカラム処理、最後にゲル濾過にて精製を行った。得られた VII 型コラーゲンは SDS-PAGE 電気泳動にてシングルバンドになる。

精製されたリコンビナント VII 型コラーゲンを phosphate buffered saline (PBS) に 1mg/ml の濃度に溶解した。次に、100 $\mu$ g を含む 0.1ml を 10 匹のマウ

スの皮内に局注し、局所の反応性と全身性の反応を検討した。対照は phosphate buffered saline (PBS) のみのものとした。

次に、ヌードラットの背部皮膚に2cm四方の潰瘍を作成して、その部にVII型コラーゲンのノックアウトマウスの皮膚を移植し、皮膚が生着した1週間後実験に使用した。精製したリコンビナントVII型コラーゲン蛋白20 $\mu$ gを生食に1,0mlに溶解し、3日おきに、ヘアレスラットおよび植皮されたVII型コラーゲンノックアウトマウスの皮内に局所注射した。5回リコンビナントVII型コラーゲンを投与した後、投与部位から皮膚を採取し、免疫学的にVII型コラーゲンの発現を検討した。

## C 研究成果

### リコンビナントVII型コラーゲン安全性

リコンビナントVII型コラーゲンを100 $\mu$ g投与したマウスでは、すべてのマウスに全身反応は認めなかった。さらに、投与部位においても、一週間まで確認したが、紅斑、出血、腫瘍形成などの異常な所見は認めなかった。

### ヘアレスラットへの投与

ヘアレスラットに計5回投与した後に皮膚を採取し、VII型コラーゲンへのモノクローナル抗体を用いて、VII型コラーゲンの沈着を確認した。その結果、投与部位に一致して、VII型コラーゲンが基底膜に沿って線状に沈着していた。その他、表皮などには異常に沈着は認めなかった。

### VII型コラーゲンのノックアウトマウスへの投与

次に、栄養障害型表皮水疱症のモデルマウスであるVII型コラーゲンのノックアウトマウスの皮膚に投与を行った。ノックアウトマウスの多くは、2-3日で死んでしまう。予備実験で、生後すぐにVII型コラーゲンの投与を行ったが、ほとんどが対照もマウスと同様に死ぬため5回投与することができなかった。そこで、ノックアウトマウスの皮膚を無免疫のヌードラットに移植して、その皮膚にリコンビナントVII型コラーゲンを投与した。その結果、VII型コラーゲンが基底膜に線状に染色された。

## D 考察

VII型コラーゲンは、表皮真皮境界部に存在するアンカリングフィブリルの構成成分である。VII型コラーゲンの遺伝子に変異があると栄養障害型表皮水疱症が発症し、また自己抗体が産生されると自己免疫水疱症である後天性表皮水疱症が発症する。このような事実よりVII型コラーゲンは表皮と真皮の接着に最も重要な分子の一つであることが明らかになった。さらに、それらの疾患では、通常の熱傷などの潰瘍と比較して、創傷治癒が著名に遷延することが知られている。

創傷治癒を促進する作用があるtransforming growth factor (TGF)- $\beta$ がVII型コラーゲン発現を強力に増強すること、治癒過程にある潰瘍底にある新生真皮に大量のVII型コラーゲンが検出されることから、VII型コラーゲンが創傷治癒

に必須のものであることが証明された。このような背景から、表皮細胞が遊走する潰瘍面に VII 型コラーゲンが豊富に存在すると上皮化が容易におこり、創傷治癒が促進されると推測される。

前年の実験では、合成 VII 型コラーゲンの dish に添加することにより、著明に表皮細胞と線維芽細胞の遊走が有意に上昇することが確かめられた。この結果は、VII 型コラーゲンの創傷治癒促進作用は、それらの細胞の遊走を亢進することによると考えられた。表皮細胞が線維芽細胞に比較して、より遊走の亢進を示したことについては、今回の実験だけでは不明で、今後の問題と考えられた。一方これらの実験は、我々の合成した VII 型コラーゲンが、本来の機能を兼ね備えたリコンビナント蛋白であることも示していた。今回の実験では、そのリコンビナント VII 型コラーゲンを実験動物に投与して、その安全性と有用性を検討した。

先ず、安全性のチェックのため、大量のリコンビナント VII 型コラーゲンをマウスに投与した。今回個々のマウスには、VII 型コラーゲンを 100 $\mu$ g 投与した。ヒトの臨床研究では、1 部位に 300 $\mu$ g を投与予定であるので、約 20g のマウスでは、プロキロ当たり、ヒトの約 600 倍の量となる。それほど大量の VII 型コラーゲンを投与しても、全身の副作用は認められず、局所の異常反応もなかった。この結果は、少なくとも、我々が精製したリコンビナント VII 型コラーゲンには毒性がないことが確かめられた。

次に、このリコンビナント VII 型コラーゲンの栄養障害型患者への治療法としての有効性を検討するため、先ず、正常のラットの皮膚に局注した。VII 型コラーゲンは表皮細胞から産生され、表皮から基底膜に移行すると考えられているので、真皮に局注された VII 型コラーゲンが基底膜に集まるかは疑問であった。しかし、そのリコンビナント VII 型コラーゲンをラットの皮膚に局注すると基底膜に沈着することを確認した。さらに、我々は栄養障害型のモデルである VII 型コラーゲン遺伝子のノックアウトマウス（劣性栄養障害型のモデルマウス）の水疱部にヒト VII 型コラーゲン蛋白を局注する実験を行った。確かに、VII 型コラーゲンが水疱の基底膜部に沈着することを確認している（データは提示せず）。しかしノックアウトマウスは生後間もなく死亡するため、経過を比較的長期に VII 型コラーゲンの沈着の有無を確認することができなかった。そこで、ノックアウトマウスの皮膚を採皮し、ヌードラットに植皮後、その皮膚にヒト VII 型コラーゲン蛋白を局注した。その結果、ノックアウトマウスの基底膜部に VII 型コラーゲン蛋白が組み込まれ、VII 型コラーゲン投与が本症の表皮真皮の解離の改善に効果がある可能性が示唆された。

動物の真皮内に注入されたヒト VII 型コラーゲン蛋白がどのように基底膜に集積されるかどうかは不明であるが、この結果、VII 型コラーゲン蛋白補充療法は栄養障害型表皮水疱症患者における治療選択肢の 1 つになると考えられる。

## E 結論

我々の合成したリコンビナント VII 型コラーゲンは安全性が高く、栄養障害型表皮水疱症患者に認められる表皮真皮の解離の改善に効果がある可能性が示唆された。この結果を基に、次に臨床治験に進む予定である。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

論文の投稿準備中。

H 知的財産の出願・登録状況

特になし。

VII 型コラーゲンの遺伝子の皮膚細胞への導入

分担研究者 古市泰宏

株式会社ジーンケア研究所 代表取締役研究所長

研究要旨

VII 型コラーゲン遺伝子の変異により生ずる栄養障害型では、VII 型コラーゲン遺伝子を患者の表皮細胞や線維芽細胞に導入してから、それらの細胞を移植する遺伝子治療の臨床応用が期待されている。今回、我々が確立したレトロウイルス法にて、VII 型コラーゲンの発現が全くない Hallopeau-Siemens 劣性優性栄養障害型患者の表皮細胞と線維芽細胞に VII 型コラーゲン遺伝子の導入を行った。遺伝子の導入効率は約 30% であり、培養上清のウェスタンブロットにて正常の VII 型コラーゲンが発現されていることを確認した。さらに、遺伝子導入表皮細胞と線維芽細胞で VII 型コラーゲンの発現量を比較したところ、その量はほぼ同様であった。以上の結果から、栄養障害型表皮水疱症の遺伝子の標的細胞として、表皮細胞に加えて線維芽細胞も有力候補となることが示唆された。

A 目的

表皮水疱症は軽微な外力により、皮膚に容易に水疱や潰瘍を生ずる疾患の総称である。近年の皮膚分子生物学の進歩により、VII 型コラーゲンなどの表皮真皮の結合に関与する構造蛋白をコードする遺伝子の変異により本症が発症することが明らかとなった。しかしながら、現在までに根本的な治療法はなく、皮膚の細胞に VII 型コラーゲンの遺伝子を導入する遺伝子治療の開発が期待されている。我々は、通常のレトロウイルス法に、レトロネクチンと VSV-G エンベロープタンパクを使用する方法を開発することにより、VII 型コラーゲン遺伝子を表皮細胞に高率に導入する方法を確立している。

今回我々はその方法を用いて、VII 型コラーゲンの発現が全くない Hallopeau-Siemens 劣性優性栄養障害型患者の表皮細胞と線維芽細胞に VII 型コラーゲン遺伝子の導入を試みた。

B 研究方法

1) Hallopeau-Siemens 劣性優性栄養障害型患者

VII 型コラーゲン遺伝子に早期終止コドン変異 1474del18 と 5818del1C を有する Hallopeau-Siemens 劣性優性栄養障害型患者から得られた、培養表皮細胞と線維芽細胞を使用した。表皮細胞は、マイトマイシン C で処理した 3T3 細胞をフィーダーとして、Dulbecco's modified Eagles' medium : Ham's

F-12 (3:1)培地に 10% 牛胎児血清, 5 µg/ml insulin, 10 ng/ml epidermal growth factor, 0.4 µg/ml hydrocortisone, and 8 ng/ml cholera toxin を添加したものである。線維芽細胞は通常の 10% 牛胎児血清加 Dulbecco' s modified Eagles' medium で培養した。

### 2) VII 型コラーゲン遺伝子の導入

VII 型コラーゲンの cDNA をレトロウイルスベクターである pDON-A1 ベクターに組み込み、gag, env, pol 遺伝子を導入してあるプロデュース細胞に導入した。導入効率をあげるため、ウイルスをレトロネクチンを添加してから加える試み、また通常の env ではなく水疱性口内炎ウイルス : VSV-G エンベロープタンパク発現ベクターを同時に導入する使用する方法を用いている。ウイルスの上清を超遠心にて種々の濃度に濃縮して培養表皮細胞と線維芽細胞の培地に添加した。

### 3) VII 型コラーゲンの発現

細胞での発現は細胞を直接 VII 型コラーゲンのモノクローナル抗体である LH7.2 で染色して検討した。また、細胞液中の VII 型コラーゲンについては、同様の抗体でイムノプロットを行い検出した。

## C 研究結果

### 1) ウイルスの濃縮の影響

種々の濃度に濃縮したウイルス粒子を Hallopeau-Siemens 劣性優性栄養障害型患者から得られた、培養表皮細胞と線維芽細胞の培地に添加して、細胞の障害の程度と VII 型コラーゲンの発現を検討した。表皮細胞と線維芽細胞ともに、1 倍濃縮では VII 型コラーゲンの陽性細胞は 5% 以下であった。濃縮を 10 倍にあげると、陽性率は約 13% に上昇した。さらに、50 倍に濃縮すると VII 型コラーゲン陽性細胞の割合は、25% に上昇した。表皮細胞と線維芽細胞ともに同じ陽性率で (図 1), 50 倍濃縮でも細胞障害は認めなかった。

### 2) 陽性細胞所見

培養細胞を VII 型コラーゲンの発現を抗体にて検討した所、表皮細胞は細胞質の周囲に、線維芽細胞は細胞全体に染色された (図 2 A)。ウエスタンブロットでは、290 kD のバンドを表皮細胞と線維芽細胞ともに認め、正常の VII 型コラーゲンが産生されていることが示唆された。また、発現量についても、両細胞で同様であった (図 2 B)。培養細胞から DNA を採取して、VII 型コラーゲンの cDNA をプローブとしてサザンブロットを行った所、表皮細胞と線維芽細胞に同様のバンドを検出し、挿入された VII 型コラーゲン遺伝子の数も同様であることが推測された (図 2 C)。

## D 考察

VII 型コラーゲン遺伝子のサイズは大きく、cDNA にしても 9 kB である。その遺伝子を培養細胞に導入する場合、通常よく用いられている、リポ製剤で VII 型コラーゲンの発現プラスミドを導入すると、その効率は 3% にも満たない。一方、VII 型コラーゲン遺伝子の発現実験にはプラスミドを導入してから抗生

剤で選択して、偶然遺伝子が細胞のゲノムに挿入された細胞を選択することになるが、その効率も  $10^7$  分の1と低く、多くのサンプルを試すには不適當である。

レトロウイルスでの表皮細胞への遺伝子導入があるが、単に通常の方法で導入した場合、導入効率は非常に低い。我々は、レトロネクチン使用によって約5倍効率があげ、さらに今回水疱性口内炎ウイルス：VSV-G エンベロープ遺伝子を導入することにより、超遠心することによる濃縮を可能にした。

今回は、実際の遺伝子治療を想定して、劣性栄養障害型患者から得られた表皮細胞と線維芽細胞に我々が確立したレトロウイルス法にて、VII型コラーゲンの遺伝子の導入を試みた。劣性栄養障害型は全くVII型コラーゲンの発現がない重症型の Hallopeau-Siemens 型と少しは発現のある非 Hallopeau-Siemens 型に分類されるが、今回は Hallopeau-Siemens 型患者の細胞を使用した。実際に、種々の濃度に濃縮したウイルス粒子を培地に添加して、細胞の障害の程度とVII型コラーゲンの発現を検討した。やはり濃縮の程度に陽性率は比例し、濃縮を50倍に濃縮するとVII型コラーゲン陽性細胞の割合は、25%にまで上昇した。尚、表皮細胞と線維芽細胞ともに同じ陽性率で(図1)、50倍濃縮でも細胞障害は認めなかった。

レトロウイルスでの導入可能な遺伝子は8-9kBであり、VII型コラーゲンのcDNAは9kBである。従って、VII型コラーゲンは限界近い長さであり、このような場合、正常なVII型コラーゲンが発現されない場合が多い。そこで、まず、遺伝子導入細胞をVII型コラーゲンの抗体で染色した。その結果、正常に近い分布であった。さらに、イムノブロットでそのサイズを確かめた所、290kDであり、正常のVII型コラーゲンが産生されていると考えられた。また、その発現量は、表皮細胞と線維芽細胞で同様であった。次に挿入されたVII型コラーゲン遺伝子量を、サザンブロットで検討した。その結果、プローブで表出されたバンドは両細胞で同様であり、挿入された遺伝子量は等量であると結論した。

## E 結論

今回我々が確立したレトロウイルス法は、表皮細胞と線維芽細胞の両者に有効であることが示された。また、栄養障害型表皮水疱症の遺伝子の標的細胞として、表皮細胞に加えて線維芽細胞も有力候補となることが示唆された。

## F 健康危険情報

特になし。

## G 研究発表

論文の投稿準備中。